家蝇金属硫蛋白基因的克隆、原核表达及活性检测

张 迪，任国栋，唐 婷，董晓寅，柳峰松*
（河北大学生命科学学院，河北保定 071002）

摘要：金属硫蛋白是一类普遍存在于生物体内、富含半胱氨酸的小分子蛋白，能螯合多种金属离子。本研究根据EST序列信息，利用RACE技术克隆到1条家蝇 *Musca domestica* 金属硫蛋白基因 *MdMtn*(GenBank登录号为GU289398)。序列分析表明，*MdMtn* cDNA全长408 bp，包含1个123 bp的开放阅读框，编码40个氨基酸残基，其中半胱氨酸残基10个，呈-C-X-C-方式排列。此蛋白理论分子量为3.8 kD，等电点为8.78。为了解家蝇金属硫蛋白对重金属的结合活性，构建了pET-DsbA-MT表达载体，并转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)宿主菌进行融合表达。研究发现MT重组菌对重金属镉的耐受性得到了明显加强，提示 *MdMtn* 基因可能在家蝇适应重金属环境中起到积极作用。

关键词：家蝇；金属硫蛋白；基因克隆；原核表达；蛋白活性
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)04-0379-06

Cloning, prokaryotic expression and activity detection of the metallothionein gene in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)

ZHANG Di, REN Guo-Dong, TANG Ting, DONG Xiao-Yin, LIU Feng-Song* (College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: Metallothioneins (MTs) are low molecular weight, metal-binding and cysteine rich proteins found in a variety of living organisms. In this study, a 408 bp cDNA encoding for a metallothionein was cloned from housefly (*Musca domestica*) by RACE based on EST information and named as *MdMtn* (GenBank accession no. GU289398). Sequence analysis showed that *MdMtn* contains a 123 bp open reading frame (ORF) encoding a protein of 40 amino acid residues. The MdMtn peptide sequence includes 10 cysteine residues with a distribution pattern of -C-X-C-. The predicted molecular weight of encoding protein is 3.8 kD with the isoelectric point (pI) of 8.78. In order to detect the MdMtn activity in binding heavy metals, the target gene was cloned into a prokaryotic expression vector pET-DsbA, and then a fusion protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). It was found that in the presence of $CdCl_2$, the expression of MdMtn significantly increased the bacteria tolerance to Cd^{2+}, suggesting that *MdMtn* may play an active role in housefly adaption to the environment with heavy metals.

Key words: *Musca domestica*; metallothionein; gene cloning; prokaryotic expression; protein activity

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于生物体内的低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白。Margoshes 和 Vallee(1957)在研究镉的生物学作用时，从蓄积镉的马肾中首次分离出该物质。随后，Kägi 和 Vallee(1960)以及 Pulido 等(1966)也相继从马和人的肾脏中分离到这种蛋白质，并将其命名为"metallothionein"。MT具有以下几个特征(Kojima *et al.*, 1979)：分子量低，一般为6~7 kD；能螯合金属离子，蛋白通过硫酯键与金属结合后，具有特殊的光吸收特征；半胱氨酸含量高，约占氨基酸残基总数的23%~33%，但不形成二硫键，分子中缺乏芳香族氨基酸和组氨酸；半胱氨酸残基在氨基酸序列中具有较为保守的排列方式(如：-C-X-C-)。金属硫蛋白的合成具有很强的可诱导性，重金属、激素、病理因素、生理因素等均可诱导其基因表达上调(Klaassen and Lehman-

基金项目：河北省自然科学基金项目(C2008000596)；国家自然科学基金重点项目(30630010)
作者简介：张迪，女，1986年生，河北柏乡人，硕士研究生，从事昆虫分子生物学研究，E-mail：zdwyw123@163.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail：liufengsong@hbu.edu.cn
收稿日期 Received：2010-01-15；接受日期 Accepted：2010-03-29

McKeeman, 1989)。

金属硫蛋白丰富的巯基含量及重金属结合能力决定了其功能的多样性。目前对于 MT 功能的研究主要集中在以下几个方面：解除重金属毒性(Vallee, 1995；Jiang *et al*., 2009)；参与体内微量元素的储存、运输和代谢(Lalioti *et al*., 2009；Van Campenhout *et al*., 2009)；增强机体对各种不良状态的适应能力(茹炳根等，1991)；拮抗电离辐射，清除体内自由基(Kumari *et al*., 1998)；防止细胞癌变(Yamamoto *et al*., 1999；Eckschlager *et al*., 2009)等。

家蝇 *Musca domestica* (Linnaeus)是双翅目环裂亚目蝇科家蝇属昆虫，其幼虫和成虫通常生活在腐败物质多的环境中，对环境中的重金属表现出极强的耐受能力。迄今为止尚未见家蝇金属硫蛋白基因的相关报道。本研究根据 EST(expressed sequence tag)信息，利用 RACE 技术克隆出家蝇金属硫蛋白基因的全长 cDNA，并利用原核表达系统对其进行了体外重组表达，研究发现转化金属硫蛋白重组质粒的大肠杆菌明显增强了对重金属镉的耐受能力。这些数据为进一步研究金属硫蛋白的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫来源：家蝇 *M. domestica* 由中国科学院动物研究所何凤琴老师惠赠，幼虫由本实验室饲养，饲养温度 25℃，RH 50% ~70%。

1.1.2 菌株与质粒：大肠杆菌 DH5α 菌和 BL21 (DE3)菌为本实验室保存，pGM-T 载体为 TIANGEN 公司产品，pET-DsbA 质粒由河北大学生命科学学院吴琛博士惠赠。

1.1.3 主要试剂：Taq DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶以及引物为南京金斯瑞生物科技有限公司产品，TRNzol 和 DNA 回收试剂盒为 TIANGEN 公司产品。

1.2 总 RNA 提取和反转录

取 2 头 3 龄家蝇幼虫，按照 TRNzol 试剂使用说明提取总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后，用紫外分光光度计进行定量检测并取 1 μg 总 RNA，以 AOLP [5′-GGCCACGCGTCGACTAGTACT$_{16}$(G/A/C)-3′] 为引物反转录合成 cDNA(Liu *et al*., 2005)。

1.3 金属硫蛋白 cDNA 克隆

在 NCBI 网站上搜索家蝇 EST 序列，并在 Blastn 中逐条进行序列比对，得到一条疑似 MT 基因的 EST 序列，GenBank 登录号为 ES608822。根据此 EST 序列设计正向引物 MtnF [5′-TTCTTGCATCTTTTAATCTA-3′]，采用 RACE 技术，以家蝇 cDNA 为模板，用 MtnF 与 cDNA 末端接头引物 AP [5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′] 进行 PCR 扩增，PCR 反应条件为：94℃ 预变性 4 min；94℃变性 30 s，50℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离、切胶回收后，连接 pGM-T 载体，转化 DH5α 感受态细胞，PCR 筛选阳性克隆后测序。

1.4 序列分析

用 Bioedit 软件进行开放阅读框(open reading frame, ORF)的搜索，将其翻译成氨基酸序列后分析氨基酸的组成。利用 ExPASy 中的 ProtParam 程序分析该蛋白的分子量和等电点。在 NCBI 网站上利用 Blastp 程序进行搜寻比对。利用 MEGA 4.0 软件对部分已知金属硫蛋白氨基酸序列进行多重比对，并通过 NJ (neighbor-joining) 法构建分子系统树。

1.5 原核表达载体的构建

根据上述步骤确定的家蝇金属硫蛋白 ORF 设计引物，扩增其编码区。上下游引物 5′端分别引入 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切位点和保护碱基，上游引物 MTexF：5′-CCGGATCCATGCCTTGCCCCTGTGGAAC-3′；下游引物 MTexR：5′-CCGAATTCTTACTTGCCGCACCTACTCT-3′。以 cDNA 为模板，MTexF 和 MTexR 为引物进行 PCR 扩增，PCR 反应条件为：94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，58℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 10 min。PCR 产物经电泳回收后，由 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ进行双酶切，然后连入双酶切后的表达载体 pET-DsbA 中，转化 DH5α 克隆宿主，经测序验证获得正确读码的重组表达质粒 pET-DsbA-MT。

1.6 融合蛋白的原核表达

用重组质粒 pET-DsbA-MT 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞，同时以空载 pET-DsbA 质粒作为阴性对照。选取阳性克隆，在含有氨苄青霉素(amp)的液体 LB 培养基中于 37℃，200 rpm 摇菌至 OD_{600}达 0.8 时，各取出 1 mL，加 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L 进行诱导表达，3 h 后取样进行

SDS-PAGE 以检测重组蛋白的表达情况。

1.7　融合蛋白的活性检测

配制 100 mmol/L 的 $CdCl_2$ 母液，121℃高压湿热灭菌 20 min。取 $CdCl_2$ 母液加无菌水配制 10，15，20，30 和 50 mmol/L 的工作液各 100 μL。将其分别涂布于不含或含 0.8 mmol/L IPTG 的两组 LB 固体培养基上，待吸收完全后，取 50 μL 上述 OD_{600}为 0.8 的 MT 重组菌均匀涂布于该两组平板上，同时以 pET-DsbA 菌株为对照，平板直径为 6 cm。37℃倒置培养 12 h，观察菌落生长情况。

2　结果

2.1　家蝇金属硫蛋白 cDNA 的序列分析

以 MtnF 和 AP 为引物进行 3′RACE 得到 1 条全长 408 bp 的 cDNA 序列，包含 1 个 123 bp 的开放阅读框，PolyA 尾上游 12 个核苷酸处存在典型的加尾信号 AATAAA(图 1)。推导的多肽序列含 40 个氨基酸残基，理论分子质量为 3.8 kD，等电点为 8.78。氨基酸组成中半胱氨酸(Cys)含量最高，占总数的 25%，其次是丝氨酸(22.5%)和甘氨酸(20%)，不含组氨酸和芳香族氨基酸。

在 NCBI 网站上利用 Blastp 进行同源搜索，发现家蝇金属硫蛋白与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和拟果蝇 *D. simulans* 的金属硫蛋白 MtnA 氨基酸序列具有较高相似性(identity = 69%)，于是将此基因命名为 *MdMtn*，序列提交 GenBank，获得登录号 GU289398。金属硫蛋白氨基酸序列多重比对结果表明：不同物种的金属硫蛋白在氨基酸数量及组成等方面存在差异，但 Cys 的分布和排列方式是非常保守的，多为-C-X-C-(X 是除半胱氨酸以外的其他氨基酸)，说明半胱氨酸对金属硫蛋白的功能极其重要。推导的氨基酸序列显示，家蝇金属硫蛋白 MdMtn 共含 10 个 Cys，其中 9 个都在保守位点上(图 2)。

基于 NJ 法建立的金属硫蛋白分子系统发育树中，脊椎动物与节肢动物彼此形成两个独立分支。节肢动物支系中的家蝇与黑腹果蝇 MT 分子进化关系最近，这两者相聚，姚虻 *Tabanus yao* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* MT 相聚，然后与两种甲壳类动物 MT 聚类；脊椎动物支系中的哺乳动物 MT 相聚并与两种鱼类 MT 同聚为一支(图 3)。

```
1     TTC TTG CAT CTT TTA ATC TAA AAA CAG AAA CAA AAC AAA ATA ATC    45
                                                                    -1

46    AAC ATG CCT TGC CCC TGT GGA ACT GGT TGC AAA TGC GCT TCT CAA    90
0         Met Pro Cys Pro Cys Gly Thr Gly Cys Lys Cys Ala Ser Gln    14

91    ACC CAA TCT TCC GGT AGC TGT GGT TGC GGT TCC TCC TGC AAA TGC    135
15    Thr Gln Ser Ser Gly Ser Cys Gly Cys Gly Ser Ser Cys Lys Cys    29

136   GGT AGC AGC TGT GGC AAG AGT AGG TGC GGC AAG TAA GGA GTC TAA    180
30    Gly Ser Ser Cys Gly Lys Ser Arg Cys Gly Lys End

181   GGA CTG AAT TGA AAG TCT CCT TTC AAG TCA TTA GCA CTG CAT TCC    225

226   CTG CAA TTC TTA CAT TAA ATT TAG TAT ATC CCT TCT CAA AAC TTC    270

271   TGA GAT CGA ATT ATA TAT TAC TTG TAA TTT AGG ATT AAA CAT TTC    315

316   AAA ATT TGT TTT CTT TCT CTT TAA AAG ACA ATG TAA TTT TTT TTA    360

361   CAA TTT ATT TTT ATA AAA TAA AAC AAA AAA TTT TAA AAA AAA AAA    405

406   AAA    408
```

图 1　*MdMtn* cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　The complete nucleotide and deduced amino acid sequences of *MdMtn*

加方框 ATG 和 TAA 分别表示起始密码子和终止密码子，具阴影的 AATAAA 示加尾信号。The boxed ATG and TAA indicate the start codon and the stop codon respectively; the shadowed AATAAA indicates the polyadenylation signal.

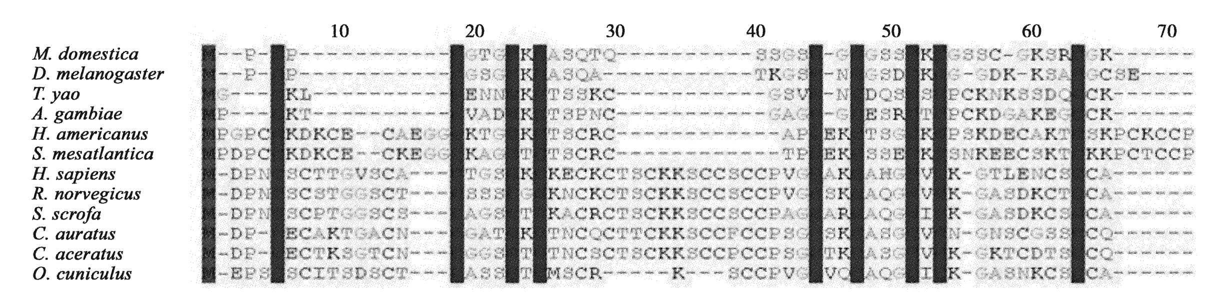


图 2 MdMtn 氨基酸序列与其他物种同源序列的比对分析

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of MdMtn with those of other species

M. domestica：家蝇 *Musca domestica*，GU289398；*D. melanogaster*：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*，NP_524299；*T. yao*：姚虻 *Tabanus yao*，ABX80078；*A. gambiae*：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*，XP_001238440；*H. americanus*：美洲螯龙虾 *Homarus americanus*，CAC42504；*S. mesatlantica*：*Segonzacia mesatlantica*，CAN86564；*H. sapiens*：智人 *Homo sapiens*，NP_789846；*R. norvegicus*：褐家鼠 *Rattus norvegicus*，NP_620181；*S. scrofa*：野猪 *Sus scrofa*，NP_001001266；*C. auratus*：鲫鱼 *Carassius auratus*，AAB32777；*C. aceratus*：*Chaenocephalus aceratus*，P52724；*O. cuniculus*：欧洲野兔 *Oryctolagus cuniculus*，S24596. 图 3 同 The same for Fig. 3.

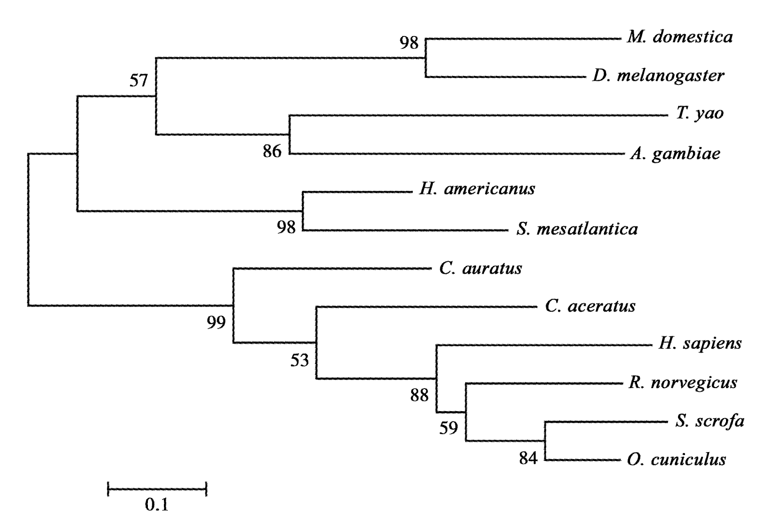


图 3 基于金属硫蛋白氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of metallothionein

使用 Kimura 双参数模型构建 NJ 系统树，分支上的数字表示 1 000 次重抽样检验中符合聚类的百分数，比例尺表示每单位长度位点替代率。NJ method with genetic distance of Kimura 2-parameter model was used. The numbers above the branches indicate the percentages of times that the species are grouped together in the bootstrap trees. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

2.2 金属硫蛋白的原核表达

含 pET-DsbA-MT 和 pET-DsbA 质粒的表达宿主菌经 IPTG 诱导 3 h 后，离心进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明，转化 pET-DsbA-MT 的宿主菌在 28.5 kD 左右有明显的诱导带，而转化空载 pET-DsbA 质粒的菌体在 24.7 kD 左右处有特异条带，差值与预测的分子量大小吻合，说明金属硫蛋白基因在宿主菌中得到了表达(图 4)。

2.3 家蝇金属硫蛋白的活性检测

将转化有 pET-DsbA-MT 或 pET-DsbA 质粒的大肠杆菌涂布到含 IPTG 的培养基上培养时发现，当 $CdCl_2$ 的工作浓度小于 20 mmol/L 时，表达 DsbA 蛋白的空载菌在培养基上的菌落数少于表达 DsbA-MT 融合蛋白的宿主菌；当 $CdCl_2$ 的工作浓度等于 20 mmol/L 时，MT 重组菌的生长状况良好，而阴性对照平板上不能检测到菌落存在(图 5)；当 $CdCl_2$ 的工作浓度为 50 mmol/L 时，IPTG 平板上均未有菌生长。而重组菌在不含 IPTG 培养基上的生长情况较差，当 $CdCl_2$ 的工作浓度为 20 mmol/L 时，两种重组菌均不再生长。说明含金属硫蛋白的重组菌明显增强了耐受重金属镉的能力。

3 讨论

目前，国际上尚无统一的 MT 分类方法，最常用的是 Binz 和 Kägi 提出的方法，两位学者根据物

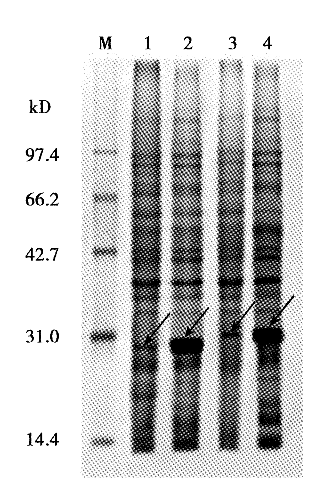
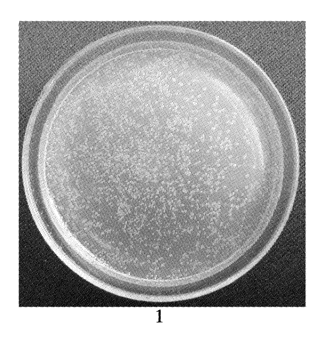


图 4　MdMtn 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of fusion protein of MdMtn

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：pET-DsbA 未诱导 Non-induced cells with pET-DsbA；2：pET-DsbA 诱导菌 Induced cells with pET-DsbA；3：pET-DsbA-MT 未诱导 Non-induced cells with pET-DsbA-MT；4：pET-DsbA-MT 诱导菌 Induced cells with pET-DsbA-MT.



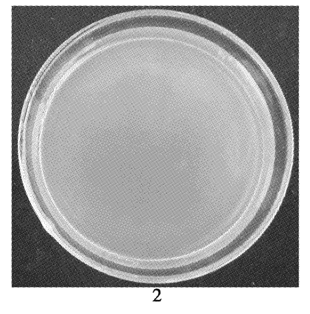


图 5　IPTG 培养皿上重组菌对重金属镉的耐受能力

Fig. 5　Tolerance of recombination strain to heavy metal cadmium on the IPTG medium

$CdCl_2$ 浓度为 20 mmol/L。The concentration of $CdCl_2$ is 20 mmol/L. 1：MT 重组菌 MT recombinant；2：空载菌 The blank test.

种的亲缘关系和半胱氨酸的排列方式将金属硫蛋白分为脊椎动物 MT、甲壳纲动物 MT、双翅目 MT、原核生物 MT、真菌Ⅰ-ⅥMT、植物 MT 等 15 个家族，每一家族还细分为数量不等的亚家族（Binz and Kägi，1999）。本研究得到的家蝇金属硫蛋白根据序列同源性和结构特征可归为双翅目 MT-1，这一类金属硫蛋白的序列特征为：C-G-x（2）-C-x-C-x（2）-Q-x（5）-C-x-C-x（2）-D-C-x-C。家蝇金属硫蛋白序列 C-G-x（2）-C-x-C-x（2）-Q-x（6）-C-x-C-x（2）-S-C-x-C 基本符合这一模式，但存在两个位点的差异。这种分类体系是基于已有序列归纳的特征，并不能涵盖所有的 MT，因此，需要建立一种合理的分类体系，这依赖于更多 MT 序列的获得。

昆虫是无脊椎动物中物种最为丰富的一大类群，是进行生物学基础研究的重要材料，同时具有巨大的资源开发前景。目前国内外关于昆虫金属硫蛋白的研究仅限于个别种类，除果蝇和 1 种跳虫 *Orchesella cincta* 外，其他种类的研究都十分薄弱（牛长缨等，2002），鉴于此，我们开展了家蝇金属硫蛋白的研究。本研究首次从家蝇体内克隆出 1 种金属硫蛋白的 cDNA 序列，对其推导的氨基酸序列进行分析发现该序列具备金属硫蛋白的典型特征，属于该蛋白家族成员。利用 Blastp 进行同源搜索，仅搜寻到果蝇的 MtnA 序列，而与其他已知金属硫蛋白同源性非常低。比对分析发现，家蝇 MT 与果蝇 MtnA 序列 N-末端同源性较高，C-末端差异较大。以上结果提示家蝇金属硫蛋白可能是 1 种新型的昆虫 MT。

镉（Cd）在土壤、空气、水和生物系统中以微量存在，由于自然因素和人类活动，Cd^{2+} 的释放量日益增加，同时酸雨作用使得环境中 Cd^{2+} 的可溶性增加，导致 Cd^{2+} 毒性增强（Tschuschke *et al.*，2002）。区域性的土壤和水域 Cd^{2+} 污染严重，直接致使农作物和畜牧水产品 Cd^{2+} 积累，Cd^{2+} 经食物链进入人体，则危害人类健康，甚至引发公害病“骨痛病”。Cd^{2+} 对所有生物都有毒性，低剂量（0.1 ~ 1 mg/kg）Cd^{2+} 处理即可抑制动植物的生长繁殖。Cd^{2+} 可导致细胞损伤，其机理可能是：（1）束缚自由巯基使蛋白变性或失活；（2）置换不同蛋白包括转录因子和酶的辅因子；（3）产生活性氧。Cd^{2+} 的高毒性还可能是由于其对嘌呤衍生物、嘧啶类、磷酸盐、卟啉以及蛋白半胱氨酸和组氨酸残基的高亲和性（张军和束文圣，2006）。金属硫蛋白能通过其半胱氨酸的巯基与许多重金属配位结合，从而降低过多重金属对生物体的毒性作用（Maroni *et al.*，1986）。为了进一步了解 MdMtn 是否具有重金属镉结合能力，对其进行了体外重组表达，并将表达 MT 的 BL21（DE3）菌株涂布于含 $CdCl_2$ 的培养基上，结果证实表达 MT 的大肠杆菌耐受重金属镉的能力得到了显著增强，暗示家蝇 MT 在大肠杆菌细胞内能够结合镉并降低其毒性，也可以推测 MT 在家蝇耐受镉污染环境中起到重要作用。这为进一步研究金属硫蛋白的功能奠定了基础，也为检测金属硫蛋白的活性提供了一种简便可行的方法。

参 考 文 献（References）

Binz PA，Kägi JHR，1999. Metallothionein：Molecular evolution and

classification. In: Klaassen C ed. Metallothionein. Vol. IV. Birkhauser, Basel. 7 - 13.

Eckschlager T, Adam V, Hrabeta J, Figova K, Kizek R, 2009. Metallothioneins and cancer. *Current Protein & Peptide Science*, 10 (4): 360 - 375.

Jiang GC, Hughes S, Stürzenbaum SR, Evje L, Syversen T, Aschner M, 2009. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicol. Sci.*, 111(2): 345 - 354.

Kägi JHR, Vallee BL, 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 235(12): 3 460 - 3 465.

Klaassen CD, Lehman-McKeeman LD, 1989. Regulation of the isoforms of metallothionein. *Biol. Trace Elem. Res.*, 21: 119 - 129.

Kojima Y, Binz PA, Kägi JHR, 1979. Nomenclature of metallothionein: Proposal for revision. *Experientia Suppl.*, 34: 141 - 142.

Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M, 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radical Research*, 29(2): 93 - 101.

Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval IV, 2009. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front. Biosci.*, 14: 4 878 - 4 903.

Liu FS, Liu YC, Li FH, Dong B, Xiang JH, 2005. Molecular cloning and expression profile of putative anti-lipopolysaccharide factor (ALF) in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Marine Biotechnology*, 7(6): 600 - 608.

Margoshes M, Vallee BL, 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of American Chemical Society*, 79: 4 813 - 4 814.

Maroni G, Lastowski-Perry D, Otto E, Watson D, 1986. Effects of heavy metals on *Drosophila* larvae and a metallothionein cDNA. *Environmental Health Perspective*, 65: 107 - 116.

Niu CY, Jiang Y, Lei CL, Hu C, 2002. Studies of invertebrate metallothionein. *Chinese Journal of Zoology*, 37(1): 72 - 76. [牛长缨, 姜勇, 雷朝亮, 胡萃, 2002. 无脊椎动物金属硫蛋白的研究. 动物学杂志, 37(1): 72 - 76]

Pulido P, Kägi JHR, Vallee BL, 1966. Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry*, 5(5): 1 768 - 1 777.

Ru BG, Pan AH, Huang BQ, Zhang JY, 1991. Metallothionein. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 18(4): 254 - 259. [茹炳根, 潘爱华, 黄秉乾, 张建业, 1991. 金属硫蛋白. 生物化学与生物物理进展, 18(4): 254 - 259]

Tschuschke S, Schmitt-Wrede HP, Greven H, Wunderlich F, 2002. Cadmium resistance conferred to yeast by a nonmetallothionein-encoding gene of the earthworm *Enchytraeus*. *J. Biol. Chem.*, 277 (7): 5 120 - 5 125.

Vallee BL, 1995. The function of metallothionein. *Neurochem. Int.*, 27 (1): 23 - 33.

Van Campenhout K, Goenaga IH, Hoff PT, Moens L, Goemans G, Belpaire C, Adams F, Blust R, Bervoets L, 2010. Cytosolic distribution of Cd, Cu and Zn, and metallothionein levels in relation to physiological changes in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) from metal-impacted habitats. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 73(3): 296 - 305.

Yamamoto M, Tsujinaka T, Shiozaki H, Doki Y, Tamura S, Inoue M, Hirao M, Monden M, 1999. Metallothionein expression correlates with the pathological response of patients with esophageal cancer undergoing preoperative chemoradiation therapy. *Oncology*, 56(4): 332 - 337.

Zhang J, Shu WS, 2006. Mechanisms of heavy metal cadmium tolerance in plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32 (1): 1 - 8. [张军, 束文圣, 2006. 植物对重金属镉的耐受机制. 植物生理与分子生物学学报, 32(1): 1 - 8]

(责任编辑: 赵利辉)